◆総説◆

血友病治療製剤の最近の進歩

高 松 純 樹

Recent Advance in Clotting Factor Concentrates

Junki TAKAMATSU, M.D.

Key words: Hemophilia, clotting factor concentrate, AIDS, Hepatitis, inhibitor

はじめに

最も頻度の高い先天性出血性素因である血友病は紀元2世紀にはその存在が書物に記されているがその本体に関しては長い間明らかでなく、1950年代に入り血友病には異なる2種類のタイプがあることが明らかにされたがその実態に関しては明らかでなかった。

1970年代に始まった凝固因子の精製、生化学的研究に引き続き1980年代に入って分子生物学的研究が著しく進歩した。そして血友病の病態解析、診断は従来の凝血学的、生化学的方法に加えて分子生物学的方法も導入され著しく進歩が認められている^{1)~7)}。血友病治療製剤についてはかつてのB、C型肝炎やHIV感染を教訓としてより安全な血液製剤の開発^{8)~13)}やまた分子生物学的な手法によるリコンビナント製剤の開発がなされてきている^{14)~15)}。表1には平成8年4月以降、国内で供給を予定されている製剤を示す。本稿ではこれら国内にて供給・使用されている血友病治療製剤を中心にその著しい進歩について概説する。

1. 血友病Aに対する治療製剤(表2)

1) 高純度製剤第VIII因子製剤

ヒト第VIII因子の精製は1960年代半ばに始

まりグリシンなどを用いたクリオプレチペーション法により精製されてきたが、前述したようにHIV感染をはじめとする種々の感染症やHIV感染によらない細胞性免疫能低下などの種々の問題が認められた。このため1980年代半ばよりヒト血漿由来第VIII因子精製にあたってはヒト第VIII因子に対するマウスモノクローナル抗体を用いたaffinity chromatographyが採用され、混在する可能性のある種々のウイルス、フィブリノゲン、フィブロンectin、免疫グロブリンなどの血清タンパクの除去がすすめられた。このうちクロスエイト® M(日本赤十字社)は米国バクスター社で開発された有機溶剤/モノクローナル抗体処理第VIII因子製剤の技術導入して作製されている¹⁶⁾。この製剤はトリ-(n-ブチル)-ホスフェートおよびポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルでクリオプレチペートを処理することによりHIV、B型肝炎ウイルス等のエンベロープを有するウイルスを効果的に不活化し、第VIII因子モノクローナル抗体によるイムノアフェニティークロマトグラフィーおよびイオン交換樹脂処理によりエンベロープを有しないウイルスを除去するとともに不要な血清タンパク成分を極力除去した製剤である。製品中の第VIII因子含有量は500単位製剤では以下の通りである。

* 名古屋大学医学部附属病院輸血部〔名古屋市昭和区鶴舞町65〕: Department of Transfusion Medicine, Nagoya University, School of Medicine

表 1 わが国における使用されている（治験中・申請中を含む）血液製剤

製剤区分	製造品目	会社名	血漿区分
第 VIII 因子製剤	クロスエイト®M	日本赤十字社	献血由来
	コンファクト®F	化血研	献血由来
	コージネイト®	バイエル	リコンビナント
	(リコンビネート®)	バクスター	リコンビナント
第 IX 因子製剤	ノバクト®M	化血研	献血由来
	PPSB®-HT「ニチャク」	日本製薬	献血由来
	クリスマシン®M	ミドリ	献血由来
インヒビター製剤	ファイバ®「イムノ」	日本臓器	輸入
	オートプレックス®	バクスター	輸入
	プロプレックス®ST	バクスター	輸入
	(リコンビナント VII a)	ノボ	リコンビナント
	(MC-7)	化血研	献血由来
von Willebrand 因子製剤	コンファクト®F	化血研	献血由来
	コンコエイト®HT	ミドリ	献血由来

() は現在治験中もしくは申請中の製剤である。

表 2 第 VIII 因子製剤 (500 単位製剤) の組成と性状

	クロスエイ M®	コンファクト F®	コージネイト®	リコンビネート®
F.VIII : C (U/bottle)	614~729	548~606	545~600	516~675
1 bottle 溶解量	10 ml	20 ml	5 ml	5 ml
vWF : Ag (U/bottle)	9.5~14.5	496~1300	0.003 以下	0.002 以下
RCof (U/bottle)	ND	896~1080	ND	ND
フィブリノゲン (ng/ml ; EIA)	9.6 以下	ND	ND	ND
IgG (mg/dl)	ND	ND	ND	ND
IgA (mg/dl)	ND	ND	ND	ND
IgM (mg/dl)	ND	ND	ND	ND

FVIII : C clot (U/ml) は 61.4~72.9, FVIII : Ag (U/ml) は 54~76, vWF : Ag (U/ml) は 0.95~1.45 であり FVIII : Ag/vWF : Ag は 49~60.8 となり本製剤中の第 VIII 因子は FVIII : Ag のみで vW 因子は含有していないと考えられる。その他の血清タンパクである免疫グロブリン, フィブロンectin, フィブリノゲンは酵素抗体法による測定感度以下であり, プラスミノゲンは免疫拡散法で検出されず, 安定剤として添加されたアルブミンのみ検出された。またこの成績は高速液体クロマトグラフィーによる成績と良く一致した。

一方コンファクト® F (化学及血清療法研究所) はモノクローナル抗体による精製はないもののイオン交換クロマトグラフィーおよびウイ

ルス除去フィルターを用いて夾雑タンパクの除去, ウイルスの除去を行いさらに小品化した後に 65°C, 96 時間の乾燥加熱処理を施したものである¹⁷⁾。同時に 500 単位製剤の凝固因子含量は FVIII : C clot (U/ml) は 54.8~60.3, vWF : Ag (U/ml) は 94.6~0.130 で本製剤中の第 VIII 因子は FVIII : Ag と力価として 1.6 倍の vW 因子が含有している。その他の血清タンパクである免疫グロブリン, フィブロンectin, フィブリノゲンは酵素抗体法による測定感度以下であり安定剤として添加されたアルブミンのみ検出された。このように本製剤は血友病 A のみならずフォンビルブランド病治療に用いられる。

2) 組み換え型凝固第 VIII 因子製剤

1984 年米国の二つのベンチャー企業はほぼ同時に第 VIII 因子に関する遺伝子クローニングとその発現を発表した¹⁴⁾¹⁵⁾。これにより組み換え型凝固因子は夢から現実のものとなりその技術を導入した二つの企業が世界的な規模で臨床治験を開始した。

a. コージネイト® (バイエル社)

コージネイト® (バイエル社) はヒト第 VIII 因子 cDNA を組み込んだプラスミッドをベビーハムスターの腎細胞 (BHK) にトランスフェクトしこれを培養増殖させ、培養液中に放出された第 VIII 因子をイオン交換クロマトグラフィー、マウスモノクローナル抗体によるイムノアフィニティークロマトグラフィーにて純化精製した製剤である¹⁸⁾。500 単位製剤の凝固因子含量は FVIII:C (U/ml) は 109~120, vWF:Ag (U/ml) は 0.003 以下で VIII:Ag のみを含有する製剤である。

b. リコンビネート® (バクスター社)

リコンビネート® (バクスター社) はヒト第 VIII 因子 cDNA を組み込んだプラスミッドをチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) にトランスフェクトし培養液中に放出された第 VIII 因子をマウスモノクローナル抗体によるイムノアフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーにて純化精製した製剤である¹⁹⁾。500 単位製剤の凝固因子含量は FVIII:C clot (U/ml) は 51.6~67.5, vWF:Ag (U/ml) は 0.002 以下でありコージネイト® (バイエル社) と同様 VIII:Ag のみを含有する製剤である。また夾雑タンパクとして考えられるマウス IgG, CHO 細胞タンパクの混入は認められていない。

3) 血友病 B に対する治療製剤

モノクローナル抗体精製第 IX 因子

従来より血友病 B 治療に用いられてきたプロトロンビン複合体はその名の通り種々の濃度のビタミン K 依存性凝固因子 (プロトロンビン, 第 VII, IX, X 因子, プロテイン C, S) を含有しており、手術時などの大量投与の際には時に血栓症, DIC が認められることもあった。また第 VIII 因子製剤と同様に含有血液型抗体

による溶血性貧血, アロ抗原による免疫系機能への影響が危惧されている。

そのために第 IX 因子のみの製剤の開発が望まれていたがわが国では 1992 年よりモノクローナル抗体精製第 IX 因子であるノバクト® M (化学及血清療法研究所) が上梓された。本製剤はイオン交換クロマトグラフィーとモノクローナル抗体カラムを使用することにより夾雑蛋白やウイルスを除去されたものであり、さらに最終段階で 65°C, 96 時間乾燥加熱処理が行われている。500 単位製剤中の凝固因子は IX 因子 (IX:C) (U/ml) 59~62.5 でこれ以外のビタミン K 依存性凝固因子濃度は検出されずまた活性型因子トロンビン, 活性型 X 因子も検出されていない。その他の免疫グロブリン, 血液型抗体, さらにアフィニティークラムに用いられるマウス IgG も検出されていない²⁰⁾。

2. 臨床成績

1) 高純度精製第 VIII 因子製剤

a. 生体内動態

クロスエイト® M (日本赤十字社) では血友病 A 患者 6 例に 50 単位/kg を目標として投与したところ生体内回収率は 55.8~72.4% (平均 64.5%) であった。また血中半減期は上記と同様の条件にて行ったところ 13.5~18 時間で平均 15.1 時間であった²¹⁾。コンファクト® M (化学及血清療法研究所) では血友病 A 患者における平均生体内回収率 77.4%, 平均血中半減期は 11.6 時間であった。またフォルビルブランド病患者におけるそれはおのおの 121.3%, 17 時間であった¹⁷⁾²²⁾。

b. 止血効果¹⁷⁾²¹⁾²²⁾

クロスエイト® M (日本赤十字社) における止血効果は患者 15 症例 (212 出血) に対しては著効 50.3%, 有効 36.3% でこの 2 者をあわせた有効率は 86.6% であった。コンファクト® F (化学及血清療法研究所) では血友病 A 患者 65 症例 (967 出血) に対しては著効 64.2%, 有効 29.3% でこの 2 者をあわせた有効率は 93.5% であった。またフォルビルブランド病患者 14 症例 (63 出血) に対しては著効 76.2%, 有効 22.2% でこの 2 者をあわせた有効率は 98.4%

であった。

2) 組み換え型凝固第 VIII 因子製剤

組み換え型製剤はわが国のみならず諸外国の成績も報告されているがここでは国内の成績を紹介する。

a. 生体内動態

コージネイト®(バイエル社) 14 例には高純度精製第 VIII 因子製剤と同様に 50 単位/kg を投与し平均生体内回収率は $72.3 \pm 13.5\%$ 、血中半減期は 18.0 ± 7.4 時間の成績を得た。さらに治療開始後 25 週目まで回収率試験を施行した 4 例の平均値は 70~80%、25 週目では $72.9 \pm 11.3\%$ とほぼ一定の値で推移した²³⁾。リコンビネート®(バクスター社) については 8 例に 50 単位/kg を投与した。得られた平均生体内回収率は $87.7 \pm 19.7\%$ 、血中半減期は 13.6 ± 6.6 時間であった。さらに治療開始後繰り返して行った回収率試験では平均値は 70~90%、最終時には $87.5 \pm 16.2\%$ とほぼ一定の値で推移した²⁴⁾。

b. 止血効果²³⁾²⁴⁾

コージネイト®(バイエル社)における止血効果は患者 19 症例 (776 出血) に対しては著効 57.3%、有効 23.7% でこの 2 者をあわせた有効率は 81.1% であった。リコンビネート®(バクスター社) では血友病 A 患者 26 症例 (908 出血) に対しては著効 51.9%、有効率 29% でこの 2 者をあわせた有効率は 80.8% であった。

3) モノクローナル抗体精製第 IX 因子²⁰⁾

a. 生体内動態

第 IX 因子はインヒビターが存在しない状態では体重 1 kg あたり一単位の投与にて血中のレベルは約 1% 上昇するといわれているが、20 例の血友病 B 患者に 50 単位/kg 投与したところその体内回収率 84.3%、血中半減期は 24 時間であった。この成績はモノクローナル抗体を使用せずに精製された製剤とのクロスオーバー試験にて得られた成績に一致するものであった。

b. 臨床成績

ノバクト® M における止血効果は患者 21 症例 (223 出血) に対しては著効 62.8%、有効 36.8% でこの 2 者をあわせた有効率は 99.6%

であった。

3. 副作用

1) 高純度精製第 VIII 因子製剤

クロスエイト® M (日本赤十字社) の治験時における成績では効果判定に登録された 15 例の血友病 A 患者の 212 回の出血に対して 306 回の製剤が投与されたが特記すべき副作用は認められなかった。コンファクト® F (化学及血清療法研究所) では 72 症例の血友病 A において 1,413 回の輸注が行われ、3 例・5 回の副作用が観察された。これは発疹、蕁麻疹、悪心等であったがいずれも一過性で特別な処置なく消失した。フォンビルブランド病 22 例ではこのような副作用は観察されていない。

2) 組み換え型凝固第 VIII 因子製剤

組み換え型における副作用報告では、コージネイト® (バイエル社) においては血友病 A 20 例に対して 1,247 回の投与が行われたが 2 回のみで嘔気と、注射部位の血管痛でいずれも軽度、一過性であった。リコンビネート®(バクスター社) では 26 例の血友病 A に 908 回投与されたが副作用報告はなかった。外国における治験ではコージネイト® (バイエル社) では口内異味感、灼熱感、注射部位での紅斑、めまい、血圧低下、胸部圧迫感が認められたが全体の 0.75% であり、いずれも軽微でこのために中止例は認められなかった²⁵⁾。またリコンビネート®(バクスター社) においても軽度の皮膚紅斑、口内乾燥感、めまい、嘔気が認められたがくりかえし投与を続けたが再発例はほとんどなかった²⁶⁾。

3) モノクローナル抗体精製第 IX 因子

ノバクトは 24 例の血友病 B に対して 411 回の投与が行われたが副作用は認められなかった。

4. インヒビター

次に血友病治療上最も重要でかつ未だに根本的解決がなされていない問題の一つに凝固因子に対する抗体 (インヒビター) 産生があり、血友病 A 患者の約 10~15% に抗体が産生されるといわれているがなぜ一部の患者にのみ抗体が産生されてくるのかは正確なメカニズムについて

ては未だ不明といわざるを得ない。わが国においてなされた高純度精製第 VIII 因子製剤、組み換え型第 VIII 因子製剤、モノクローナル抗体精製第 IX 因子では治験に参加した症例の中ではインヒビターの発生がなかった。その後の調査²⁷⁾やあるいは諸外国における組み換え型第 VIII 因子製剤の治験においてはインヒビターの発生が報告されている²⁸⁾。血漿由来血液製剤による抗体産生の頻度は正確には明らかでないが、2.4~24%とされている^{29)~31)}。しかしながら組み換え型第 VIII 因子製剤投与患者における抗体産生については過去に血漿由来血液製剤を使用した症例と現在までに治療歴のない症例とでは明らかに発生頻度が異なり未治療患者ではかなり高率である。従来の検討ではその研究がほとんどレトロスペクティブであり組み換え型のように頻回に抗体の有無を検索したわけではないからである。

1993 年 Lusher らの 95 例の未治療患者の成績²⁸⁾ (コージネイト® (バイエル社) 使用) では 2.4 カ月から 3.5 年 (平均 1.5 年) の間に受けた総輸注回数は 3,315 回で、検討した 81 例中 16 例に抗体が認められ発生までの中間値は 9 日であった。この 16 例中 9 例では抗体値は極めて低値であったり治療を継続していく間に低値となった。4 例では治療中に消失し、また 5 例は 10 Bethesda 単位以下にとどまっていた。この成績よりこの製剤におけるインヒビター産生頻度は実際高率ではなく、またそのインヒビター値も決して高くならないことが明らかになった³¹⁾。

現時点ではインヒビターの産生に関する詳細なメカニズムは明らかにされておらず、遺伝的素質 (HLA)、治療開始時の年齢、輸注量 (輸注回数) などが関与しているのではないかと推測されている。したがって治療中にはインヒビターの発生が起ころうることであるという認識は重要であり慎重な経過観察・対応が望まれる。

5. ウイルス感染

血液製剤中のウイルス不活性化の努力はまずドイツにおいて血友病 B 製剤 (第 IX 因子製剤もしくはプロトロンビン複合体) に β -propionolactone と紫外線にて不活化する方法

が導入され、少なくともこの製剤による肝炎の感染の報告はない³²⁾。第 VIII 因子製剤ではこの方法を用いると第 VIII 因子自体が失活するために使用されなかった。

加熱処理は既に 1940 年代からアルブミン製剤に対しては行われていたが、凝固因子製剤では加熱による蛋白の失活や新たな抗原の出現の恐れがあるために、米国では長い間導入されずにいたがようやく 1970 年代後半になって凍結乾燥後の乾燥加熱が導入された。しかしこの方法でも非 A 非 B 肝炎に対しては必ずしも有効ではなかった³³⁾。その後液状加熱の導入により肝炎の伝播についてはようやく解決されつつある。

HIV については肝炎ウイルスよりも加熱処理で容易に不活化されるが、不幸にも初期の加熱製剤により HIV 感染が認められた³⁴⁾。しかし肝炎ウイルスや HIV に対しては加熱の温度、時間、あるいは蒸気加熱などの技術の開発で改良されてきている。ところが B19parvo virus は加熱によって減少はしているが、完全にゼロとはなっていない。さらにこのウイルスは HIV や肝炎ウイルスと異なり脂質にて覆われていないために solvent-detergent に対して抵抗性である。そこで必要な凝固蛋白以外のウイルスを含む夾雑蛋白を可能な限り除去する方法が開発され、特に凝固因子に対するモノクローナル抗体を用いた immunoaffinity クロマトグラフィーによるその純度は著しく向上してきている。表 3 は現在使用されている主な製剤についてのウイルス不活化法を示す。基本的に 1) 製剤により処理 2) モノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィー 3) イオン交換クロマトグラフィー 4) 膜濾過 5) 加熱 (乾燥、液状、蒸気) 等があり、これらを種々組み合わせで行われている。

新しい製剤によるわが国における現在までの検討では HBV, HCV, HIV 抗体が陽性化した症例の報告はなくこの点においても安全であることが明らかになった^{20)~24)}。

6. 細胞性免疫能に対する影響

従来より血液製剤の投与を受けた血友病患者

表 3 凝固因子製剤のウイルスの不活化

ウイルスの不活化	
クロスエイ®M	TNBP/オクトキシノール 9 処理, モノクローナル抗体処理
コンファクト®F	ウイルス除去膜濾過, 乾燥加熱 (65°C, 96 時間)
コージネイト®	モノクローナル抗体処理, イオン交換クロマトグラフィー
リコンビネート®	モノクローナル抗体処理, イオン交換クロマトグラフィー
ノバクト®M	モノクローナル抗体処理, ウイルス除去膜濾過, 乾燥加熱 (65°C, 96 時間)
ファイバ®「イムノ」	蒸気加熱 60°C, 10 時間, 1190 mbr+80°C, 1 時間, 1375 mbr
オートプレックス®	20% エタノール処理, 乾燥加熱 (60°C, 144 時間)
プロプレックス®ST	20% エタノール処理, 乾燥加熱 (60°C, 144 時間)
r-VII a	モノクローナル抗体処理, イオン交換クロマトグラフィー
MC-7	モノクローナル抗体処理, ウイルス除去膜濾過, 乾燥加熱 (65°C, 96 時間)

では AIDS 患者において認められるような T リンパ球サブセットの異常や CD4/CD8 比の低下など細胞性免疫機能の異常が報告されていた。この大部分はその後 HIV 感染による細胞性免疫機能不全であることが明らかになったが, HIV 抗体陰性患者 (非感染患者) でも同様の細胞免疫不全状態が認められることが明らかになった³⁵⁾。さらに Fc レセプターを介した貪食作用や殺菌作用等の単球機能の異常についても異常が認められている。このような免疫異常は特に精製度の低い高単位濃縮製剤で強力な治療を受けている患者に高頻度に認められている。そのメカニズムの詳細については十分理解されていないが, 製剤中に含まれるアロ抗原によるためではないかと推定されている。

ここに述べた製剤ではヒトアロ抗原や種々のウイルスの夾雑は現時点では認められないが第 VIII 因子-抗第 VIII 因子免疫複合体の混入, あるいは測定感度以下の異種タンパクの混入は完全に否定はできないので今後の症例の経過観察が重要である。

7. 抗体 (インヒビター) に対する治療

活性化 VII 因子製剤 (VIIa)

凝固第 VII 因子は肝臓にて合成され, zymogen として循環血中に存在するビタミン K 依存性の凝固タンパクである³⁶⁾。活性化 X 因子 (Xa) により限定分解を受けて活性型 (VIIa) となり, VIIa は第 X, IX 因子を活性化する³⁷⁾。VIIa はトロンビン, 活性化 X 因子, 活性化 IX

因子と異なりアンチトロンビン III にて速やかに不活化されないことから半減期が 2 ないし 3 時間で十分な止血が完了するものと考えられる。さらに最近の研究により精製系ではあるが VIIa はカルシウムイオンとリン脂質存在下で, 組織因子の関与無しに第 X 因子を活性化することが明らかにされた³⁸⁾。このことはインヒビターの治療において VIIa が有効である理論的根拠の一つであり, また VIIa の投与を受けた患者血漿では活性化部分トロンボプラスチン時間が短縮するという結果の根拠にもなっている。

現在わが国ではリコンビナント VIIa 製剤とヒト血漿由来 VIIa 製剤の治験が行われている。

a. リコンビナント VIIa 製剤

インヒビターを有する友友病 A, B 患者を対象にして, rVIIa の単回投与における安全性と薬物動態, さらに長期投与における安全性と止血効果を検討した³⁹⁾。その結果, 血中半減期は第 I 相試験では 2.5 ± 0.5 時間 ($N=4$), 第 III 相試験では 2.6 ± 0.5 時間であり, 長期試験投与における体内回収率は 17.3~22.4%であった。出血治療の rFVIIa の投与量は原則として $70 \mu\text{g}/\text{kg}$ とし, 軽度, 中等度の関節内, 筋肉内出血あるいは出血開始より 6 時間以内の出血に対しては主治医の判断により $35 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与も可とした。止血効果は全出血数 407 にたいして有効と判定されたものは 296 (72.7%) ときわめて高率であり, また副作用は 1 例もなかった。rVIIa

の製造過程に混入する可能性の種々の動物タンパク (Baby hamster kidney 細胞タンパク, マウス IgG, ウシ血清蛋白) および rVIIa それ自体に対する抗体産生は認められなかった。

投与後の凝血学的検査にても D-ダイマー, 血小板数, フィブリノゲン値の変化はほとんど認められず過凝固状態の心配は認められなかった。また本剤投与後にインヒビター値の上昇も認められなかった。

ヒト血漿由来 VIIa 因子の治療は現在進行中であるが, 基本的な成績はリコンビナント製剤との間にはないものと考えられている。

おわりに

血友病の補充療法はその病態の解明以前に既に同種輸血が有効であることが経験的にわかっていたが, 本格的な補充療法は全血, 血漿輸血から濃縮製剤による変換以降である。

この濃縮製剤は血友病の補充療法にとって画期的であり, また血友病患者自身の生活は大きく変わり社会的な活動範囲も画期的に拡大した。しかし 1970 年後半に開発された大量のプール血漿を原料とする高濃縮製剤はその有効性とはうらはらに HIV 感染症, エイズをはじめ, 種々の血液由来の感染症を以前以上に拡大し患者は再び血友病に加えてこれらの疾患との戦いを強いられている。

現在の血液製剤は上記したように従来製の製剤に比して安全であることは断言できるが, 完全であるということとはできない。われわれはこのような何事にもかえることができない悲劇を教訓としてより安全で有効な血液製剤の開発をめざす必要がある。

文 献

- 1) Suehiro K, Tanimoto M, Tetsuhito Kojima, Junki Takamatsu, Tadashi Kamiya and Hidehiko Saito. Carrier detection in Japanese hemophilia A by use of three intragenic and two extragenic factor VIII DNA probes. *J Lab Clin Med* **112**: 314-318, 1988.
- 2) Mitsune Tanimoto, Tetsuhito Kojima, Tadashi Kamiya, Junki Takamatsu, Kanji Ogata, Yuichi Obata, Minoru Inagaki, Atsuo Iizuka, Takeshi Nagao, Kotoku Kurachi and Hidehiko Saito. DNA analysis of seven hemophilia B patients with anti-factor IX antibodies: Relationship to clinical manifestation and evidence that the abnormal gene was inherited. *J Lab Clin Med* **112**: 307-303, 1988.
- 3) Mitsune Tanimoto, Tetsuhito Kojima, Kanji Ogata, Motohiro Hamaguchi, Junki Takamatsu, Tadashi Kamiya and Hidehiko Saito. Extragenic factor IX gene RFLP is present and useful for carrier diagnosis in Japanese Hemophilia B. *Acta Haematologica Japonica* **52**: 774-777, 1989.
- 4) Kazuhisa Suehiro, Shun-Ichiro Kawabata, Toshio Miyata, Hiroyuki Takeya, Junki Takamatsu, Kanji Ogata, Tadashi Kamiya, Hidehiko Saito, Yoshiyuki Niho and Sadaaki Iwanaga. Blood clotting factor IX BM Nagoya Substitution of arginine 180 by tryptophan and its activation by α -chymotrypsin and rat mast cell chymase. *J Biol Chem* **264**: 21257-21265, 1989.
- 5) Tadashi Matsushita, Mitsune Tanimoto, Koji Yamamoto, Isamu Sugiura, Motohiro Hamaguchi, Junki Takamatsu, Tadashi Kamiya and Hidehiko Saito. DNA sequence analysis of three inhibitor-positive hemophilia B patients without gross gene deletion: Identification of four novel mutations in the factor IX gene. *J Lab Clin Med* **116**: 492-497, 1990.
- 6) Motohiro Hamaguchi, Tadashi Matsushita, Mitsune Tanimoto, Isao Takahashi, Koji Yamamoto, Isamu Sugiura, Junki Takamatsu, Kanji Ogata, Tadashi Kamiya and Hidehiko Saito. Three distinct point mutations in the factor IX gene of three Japanese CRM⁺ hemophilia B patients (factor IX BM Nagoya 2, factor IX Nagoya 3 and 4). *Thrombo and Haemosta* **65**: 514-520, 1991.
- 7) Tadashi Matsushita, Mitsune Tanimoto, Koji Yamamoto, Isamu Sugiura, Junki Takamatsu, Tadashi Kamiya and Hidehiko Saito. Direct carrier detection in hemophilia B kindred: use of modified primers (mutagenic primers) for enzymatic amplification of the factor IX gene. *Thrombo Res* **63**: 355-361, 1991.

- 8) Horowitz B, Wiebe ME, Lippin A, Stryker MH. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. I. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri (n-butyl) phosphate detergent combinations. *Transfusion* **25**: 516-522, 1985.
- 9) Horowitz B, Wiebe ME, Lippin A, Vandesande J, Stryker MH. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. II. physical methods. *Transfusion* **25**: 523-5527, 1985.
- 10) Gomperts ED. Procedures for the inactivation of viruses in clotting factor concentrates. *Am J Hematol* **23**: 295-305, 1986.
- 11) Thomas DP. Reducing the risk of virus transmission by blood products. *Br J Hematol* **70**: 393-395, 1988.
- 12) Ways to reduce the risk of transmission of viral infections plasma and plasma products: a comparison of methods, their advantages and disadvantages. *Vox Sang* **54**: 228-245, 1988.
- 13) Brettler DB, Levine PH. Factor concentrates for treatment of hemophilia: which one to choose? *Blood* **73**: 2067-2073, 1989.
- 14) Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amplett GW, Foster WB, Coe ML, Knutson GJ, Fass DN, Hewick RM: Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. *Nature* **312**: 342-347, 1984 Gitscher J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM: Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* **312**: 326-330, 1984.
- 15) Griffith M, Preparation of high specific activity plasma AHF by anti-FVIIIc affinity chromatography. *Thromb Haemost* **58**: 307, 1987.
- 16) 齋藤英彦, 高松純樹, 稲垣 稔, 三間屋純一, 白幡 聡. von Willebrand 病に対する加熱第 VIII 因子濃縮製剤コンファクト F の止血効果—加熱第 VIII 因子濃縮製剤 (EP-8) の多施設 von Willebrand 病患者に対する臨床的效果—. 基礎と臨床 **27**: 579-600, 1993.
- 17) Eaton DL, Hass PE, Riddle L, Mather J, Wiebe M, Gregory T, Vehar GA. Characterization of recombinant human factor VIII. *J Biol Chem* **262**: 3285-3290, 1987.
- 18) Kaufman RJ, Wsley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* **263**: 6352-6362, 1988.
- 19) 齋藤英彦, 高松純樹, 神谷 忠, 藤巻道男, 稲垣 稔, 三間屋純一. モノクローナル抗体精製加熱第 IX 因子 (MC-9) の臨床試験成績. 基礎と臨床 **24**: 8044-8064, 1990.
- 20) 藤巻道男, 後藤三雄, 宮崎 保, 桜田恵右, 森 和夫, 石川正明, 木下忠俊, 福武勝幸, 稲垣 稔, 花房秀次, 長尾 大, 高橋芳右, 松田 保, 塩原信太郎, 齋藤英彦, 吉岡慶一郎, 木下清二, 安永幸二郎, 大久保進, 垣下栄三, 西田恭治, 上田一博, 小林正夫, 白幡 聡. モノクローナル抗体精製第 VIII 因子濃縮製剤 (RCG-11) の臨床試験成績. 基礎と臨床 **26**: 1109-1129, 1992.
- 21) 安部 英, 井形昭弘, 池松正次郎, 稲垣 稔, 神谷賢二, 神谷 忠, 河崎則之, 岸田邦雄, 木下忠俊, 白川 茂, 白川 充, 白幡 聡, 高田三千尋, 高月 清, 長尾 大, 日吉保彦, 福井 弘, 福武勝博, 三浦 亮, 森 和夫, 安永幸二郎, 吉岡慶一郎, 吉田 豊. 臨床と研究 **62**: 3640-3659, 1985.
- 22) 福井 弘, 森 和夫, 石川正明, 柴田 昭, 高橋芳右, 藤巻道男, 福武勝幸, 腰原公人, 木下忠俊, 中山明子, 浜 英永, 稲垣 稔, 花房秀次, 三間屋純一, 齋藤英彦, 神谷 忠, 高松純樹, 白川 茂, 出口克巳, 吉岡章, 嶋 緑倫, 安永幸二郎, 大久保進, 吉岡慶一郎, 木下清二, 垣下栄三, 西田恭治, 白幡 聡. 遺伝子組換えヒト第 VIII 因子製剤 BAY w 6240 の多施設共同による臨床的検討 (長期投与試験). 日本輸血学会雑誌 **37**: 593-604, 1991.
- 23) 藤巻道男, 武田武夫, 畑江芳郎, 豊田隆謙, 石川正明, 柴田 進, 高橋芳右, 松田重三, 浜 英永, 福武勝幸, 田中朝志, 稲垣 稔, 花房秀次, 本多康次郎, 三間屋純一, 齋藤英彦, 高松純樹, 緒方完治, 島田司巳, 太田 茂, 吉岡 章, 嶋 緑倫, 辻野儀一, 木下清二, 垣下栄三, 西田恭治, 白幡 聡. 血友病 A 患者に対する遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤 (BL-160) の多施設臨床評価. 日本血栓止血学会誌 **4**: 430-440, 1993.
- 24) Schwartz RS, Abildgaard CF, Aldert LM, Arkin S, Bloom AL, Brackmann HH, Brettler DB, Fukui H, Hilgartner MW, Inwood MJ, Kasper CK, Kernoff PBA, Levine PH, Lusher JM, Manucci PM, Scharrer I, Mackenzie MA, Pancham

- N, Kuo HS, Allred RU, and the recombinant factor VIII study group. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia. *N Eng J Med* **323**: 1800-1805, 1990.
- 26) Goldsmith JC, and Recombinate Study Group: Safety and efficacy of recombinant factor VIII in previously untreated hemophilia A patients: preliminary results. *Blood* **78** (Suppl): 481a, 1991.
- 27) 本多康次郎, 長尾 大. コージネイト投与後にインヒビターを発症した血友病 A 乳児例. 第 3 回 コージネイト研究会. 大阪, 1995.
- 28) Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Schwartz RS, and the Kogenate previously untreated patient study group. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. safety, efficacy, and development of inhibitors. *N Eng J Med* **328**: 453-459, 1993.
- 29) Mcmillan CW, Shapiro SS, Whitehurst D, Hoyer LW, Rao AV, Lazerson J. The natural history of factor VIII:C inhibitor in patients with hemophilia A: A national cooperative study. II. Observations on the initial development of factor VIII:C inhibitors. *Blood* **71**: 344-348, 1988.
- 30) Lusher JM, Salzman PM, and the Monoclate study group: Viral safety and inhibitor development associated with factor VIII:C ultra-purified from plasma in hemophiliacs previously unexposed to factor VIII:C concentrates. *Semin Hematol* **27** (Suppl2): 1-7, 1990.
- 31) Schwarzingler I, Pabinger I, Korninger C, Haschke F, Kundi M, Nessener, Lechner K. Incidence of inhibitors in patients with severe and moderate hemophilia A treated with factor VIII concentrates. *AM J Hematol* **24**: 241-245, 1987.
- 32) Heinrich D, Kotischke R, Berthold H. Clinical evaluation of the hepatitis safety of a beta-propiolactone/ultraviolet treated factor IX concentrate (PPSB). *Thromb Res* **28**: 75-83, 1982.
- 33) Colombo M, Mannucci PM, Carnelli V, Savidge GF, Gazengel C, Schimpf K, Transmission of non-A, non-B hepatitis by heat-treated factor VIII concentrate. *Lancet* **2**: 1-4, 1985.
- 34) Fricke W, Augustyniak L, Lawrence D, Brownstein A, Kramer A, Evatt BL. Human immunodeficiency virus infection due to clotting factor concentrates: results of the Seroconversion Surveillance project. *Transfusion* **32**: 707-709, 1992.
- 35) Stein SF, Evatt BL, McDougal JS, Laurence DN, Holman RC, Ramsey RB, Spira TJ. A longitudinal study of patients with hemophilia: immunologic correlates of infection with HTLV-III/LAV and other viruses. *Blood* **66**: 364-369, 1985.
- 36) Broze JBJr and Maferus PW: Purification and properties of human coagulation factor VII. *J Biol Chem* **255**: 1242-1247, 1980.
- 37) Osterud B and Rapaport SI: Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5260-5264, 1977.
- 38) Telgt DSC, Macik BG, McCord DM, Monroe DM, Roberts HR: Mechanism by which recombinant factor VIIa shortens the APTT; activation of factor X in the absence of tissue factor. *Thromb Res* **56**: 603-609, 1989.
- 39) 齋藤英彦, 高松純樹, 神谷 忠, 福武勝幸, 山岸哲也, 藤巻道男, 稲垣 稔, 花房秀次, 滝 正志, 山田兼雄, 三間屋純一, 緒方完治, 河崎則之, 西尾健治, 吉岡章, 嶋 緑倫, 福井 弘, 羽藤高明, 渡辺明人, 白幡聡, 有吉宣明. インヒビターを保有する血友病患者に対する遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子製剤 NN-007 の臨床評価. *血栓止血誌* **5**: 158-172, 1994.